

Vélemény

dr. Méhes Gábor

## **Új módszerek a daganatok genetikai jellegzetességeinek és heterogenitásának vizsgálata**

*c. MTA doktori értekezéséről*

Valahol a századforduló környékén szembesülhettünk azzal, hogy a technológia fejlődése könyörtelenül felülírja addigi szokásainkat, gondolkodási paneljeinket, ami paradigmaváltásként került a köztudatba. A molekuláris szintig tartó ismeretek egyre jobban részt kértek maguknak nemcsak a laboratóriumi kutatásokban, hanem, elsősorban azokon keresztül a betegágyak is. A patológia szerepe is, ha lassan, de változott, vagy még most is változóban van, . A diagnosztika nem veszítette el fontosságát, de már egyre több információkat várnak tőle, a mi esetünkben a terápia tervezéséhez. Ez az értekezés példáját mutatja azoknak a törekvéseknek, amelyek a a morfológiát még hatékonyabbá szeretnék tenni, alkalmazva a legújabb trükköket. A címben is ez a legfontosabb-

A Bevezetés 26 oldalon tárgyalja azokat a legfontosabb ismereteket, amelyek részletesen tájékoztatnak az elkövetkezőkről, az egyes részletkérdések alapjairól. A középpontban a daganatok állnak, a hozzájuk vezető úton a géneket és kromoszómákat érintő szabályozási zavarokról. Ezek pedig sokan vannak (egyre többen) és igen változatosak. Szóba kerülnek az egyes témák, sokszor elég részletesen, ami már inkább a megbeszélésbe illene. Néhány gondolat csak a leírtakról. Említi, hogy a daganatok kialakulásához nem mindig telik el hosszú idő, amíg a kritikus hibák össze nem gyűlnek, hanem nagyon gyorsan is, sajnos ezt tanúsítják a gyermekkori daganatok. Többször kerül szóba a heterogenitás (még a címben is), ami valóban az onkológiai gyakorlat egyik legkeményebb kihívása. Mióta tudjuk, hogy két sejt genetikai profilja sem azonos, a kezdeti, valószínűleg nagyon rövid monoklonális állapotot már a szubklónok megjelenése feledteti. Általában. Az is igaz, hogy a génszintű változások vagy megjelennek a fenotípusban, vagy nem. Az értekezés ezt gondosan elemzi. Csupán annyit érdemes megemlíteni, hogy az intratumorális heterogenitás mellett szerepet játszik az intertumorális (pl. primer tumor és metasztázisai) és - amiről sokszor elfeledkeztünk, bár a klinikum ezt folyamatosan visszaigazolja - a betegek közötti különbségek. Lásd például a metabolizmus sokszínűségét. A tumor genomjának átprogramozásakor talán meg lehetne említeni az epigenetikai és nem-kódoló résztvevőket. Igaz, ezekről nagyon keveset tudunk, a mázsányi adatok ellenére. Megismerkedhetünk a kromoszómák világának legújabb nomenklatúrájával, ami biztos a tanulnivalók közé tartozik. A mitózis szabályozó kinázokról és a metodikai kérdésekről később sokszor és részletesen lesz szó, ezekre most nem térek ki.

Ez a rész tehát fedi az értekezés tematikáját. Amit ki lehet emelni, ezen belül, az a logikus gondolatmenet, és az egész értekezésre jellemző világos megfogalmazás igyekezete, lényegében sikeresen. Itt említem, hogy formai szempontból kifogásolni valót nem találtam, sem a szövegben, sem az ábrákkal kapcsolatban.

A célkitűzés fogalmazza meg a legfontosabb szándékokat. A célok alpontonként jelennek meg, ezekre az eredményeknél érdemes visszatérni. A kiemelteket azért megemlítem: a technológiák fejlesztése, a daganatsejtek ploiditásának és kromoszómális összetételének jelentősége (cervix daganatelőtti állapotaiban), a perifériás vérben keringő, illetve a csontvelőben kimutatható disszeminált daganatsejtek detektálása és genetikai jellemzése, az Aurora B mitotikus kinázexpressziójának és deregulációjának meghatározása emlőrák és limfoma esetekben. Ha valaki úgy véli, hogy elég – stilszerűen – heterogén, nem szabad rá haragudni. Mielőtt a részletekre sor kerülne, fontosnak tartom megemlíteni, hogy az értekezés témájában megjelent 16 cikkből 11 2007-ben vagy előtte került közlésre, így nem csodálható, hogy a vizsgálati módszerek, eredmények felett több helyen eljárt már az idő. Ezt a jelölt sem tagadja. Véleményem szerint, az értékelésnél figyelembe kell venni, hogy a közlések időpontjában milyen új módszereket fejlesztett, megállapításokat tett az a munkacsoport, amelynek a jelölt meghatározó tagjává vált. Az is igaz, hogy néhány helyen az idő múlását meg kell említeni. A témában a naprakész tájékozottságot a 234 a felhasznált irodalom jegyzéke tükrözi.

Az eredmények (46 oldal) tekintélyes része módszertani fejlesztésekkel foglalkozik. Ide tartozik a lézer szkenningscitométer, a mikroszkópos képanalízis, és a digitális szkennerek. A LSC-t alkalmasnak találták DNS-index mérésére, ennek hormonreceptorral való együttes meghatározására. Az automatizált immuncitokémia/FISH kombinációt (AIPF) a PCR-rel azonos érzékenységgűnek találták. *Érdeklődés: milyen kérdésekre ad olcsóbb, gyorsabb választ az AIPF a PCR-technikákkal összehasonlítva.*

Gyakorlati jelentőségű, vagy lenne, az egynapos FISH bevezetése. Említésre kerül, hogy az esetek egy részében a fluoreszcens jelek minősége kifejezetten fokozódott. *A HER2 meghatározás problémáit ismerve kérdés az, hogy nem nő-e pl. a fals-pozitív esetek aránya, illetve hogy lehet ezt kizárni?*

Igen érdekes az autofluoreszcencia jelenségének alkalmazása. *Ezzel kapcsolatban mit jelent a „viszonylag szövetspecifikus emissziós mintázat”? Kérdés az is, hogy ez a módszer milyen gyakorlati kérdések megválaszolására alkalmas?*

Ugyancsak fontos feladat a molekuláris hibák szöveti kimutatása specifikus antitestekkel. *Nyilván csak a bíráló számára probléma, hogy mi van előbb – az új hiba, vagy a megfelelő antitest? A példa ennél a módszernél a BRAF V600E mutációja. A klinikai adatokkal való összehasonlítást a kis esetszám valóban nem teszi lehetővé.*

A HPV fertőzéssel kapcsolatban a cervikális citológiai mintákban a magas rizikócsoportba sorolható léziókban jellemzőnek találták az aneuploid sejteket, amelyek gyakorisága az alacsony (LSIL) és a magas (HSIL) rizikójú csoportban jelentős eltéréseket mutatott. Továbbá meghatározták a sejtenkénti kromoszómaszámot. A hiperdiploid kóros sejteket a 3-as és a 17-es kromoszómára specifikus FISH-próbákkal, majd LSC értékeléssel a sejtenkénti DNS-változásokat jól követhetőnek találták. A kópiaszám emelkedésével a két kópia aránya is egyre inkább eltért a normálistól, amit a kromoszóma instabilitás jelének tekintettek.

Adott sejtpopulációban „rejtőzködő” néhány daganatsejt kimutatása nagy kihívás. Nyilván ehhez specifikus és szenzitív markerek kellene vagy az izolált sejtek aktivitásának kimutatása. Az AIPF kombináció segítségével csontvelői mintákban a hagyományos citológiai értékeléssel szemben igen érzékenyen mutatták ki a neuroblasztoma sejteket. A három leggyakoribb genetikai eltérést (NMYC, , 1p36, 17q23) vizsgálva a sejtek között egyik mintában sem találtak eltérést, azaz heterogenitást. A daganatsejtekben az NMYC amplifikáció állandósága mellett a kópiaszám a primer és az áttéti mintákban is megegyezett. Emlőrák esetében a keringésben meglepően nagy számban találtak CK+/MUC1+ tumorsejteket. Ezek többsége apoptótikusnak bizonyult. Ez a megfigyelés azért is érdekes, sőt fontos, mert napjaink daganatok metasztatizálásával kapcsolatos egyik kulcskérdés a keringő tumorsejtek, a keringő tumorból származó DNS, sőt mikroRNS (stb) vizsgálata, hiszen az ezekben kimutatható genetikai eltérések alapján lehet következtetni a primer tumor és metasztatizálásának genetikai hasonlóságára, vagy eltéréseikre. Ennek jelentősége a daganat kezelési stratégiájának felállításában van, hiszen a metasztatikus tumorokat a primerben kimutatott hibák elleni gyógyszerekkel kezelik. A viabilitást ritkán értékelik, legtöbbször az RNS expresszióját határozzák meg. *Érdekelne, hogy jelölt a megfigyeléseiket hogyan értékeli a jelenlegi törekvések és eredmények tükrében? A saját eredmények egyezést mutatnak, de sok esetben az eltérések elég jelentősek. Elképzelhetőnek tartja-e, hogy a primer tumorban olyan markerek legyenek, amelyek a metasztatizálási hajlamot előre jelzik?*

E kromoszóma-centrikus világban igen kitüntetett szerep jut az Aurora kinázcsaládnak (A,B,C) általában, itt az egyik tagjának, a B-nek, amely igen kiterjedt vizsgálatsorozat tárgya lett. Ismertsége valóban elmarad a az A-tól (egyébként a C még inkább), bár funkciójukban több azonos vonást, elsősorban a mitotikus apparátus szabályozását, lehet felfedezni. A daganatokban játszott szerepüket illetően (ebbe tartozik a C is) már gátlószereikkel is találkozhatunk. Az A gátlására próbálják az alisertibet, B esetében a BI811283, a C ellen pedig az AMG 900. (Ezek kiragadott mai példák.) A vizsgálatokhoz emlőrákokat és limfómákat használtak. Az Aurora B aktivitását több tényezővel kapcsolatban értékelték, ezek között szerepelt a sejtproliferációt jellemző Ki67, lokalizációjánál fogva a TP53, valamint az apoptózis szabályozásában szereplő survivin, és mások. Említeni lehetett volna még a partnereket között, a topoizomeráz II-t is, amely szoros viszonyban van az Aurora B-vel, ráadásul gyakran használnak gátlására kemoterápiás szereket (pl. topotecan, irinotecan. *Lehet, hogy a topo II gátlása egyben inaktíválja az Aurora B-t, csökkenteni annak fokozott expresszióját?* A TP53-mal való kapcsolata érdekes, hiszen kodeléción is előfordul, miközben a daganatokban a p53 szuppresszori képességét veszti el, míg az Aurora B expressziója fokozódhat. *Hogyan lehet ezt magyarázni? Elképzelhető-e, hogy mindketten fontos szerepet játszanak a DNS hibáinak kijavításában (a repair-ben), egymás működését erősítve?* Nem szokatlan, de nem is gyakori az a megfigyelés mely szerint a normális szövetben magasabb a proliferációs aktivitás, mint a belőle kiinduló daganatban, reaktív csíracentrumban magasabb a proliferációs aktivitás, de míg az előzőben a keletkezés és pusztulás egyensúlya nem vezet a sejtek szabályozatlan felhalmozódáshoz, az utóbbiban viszont ez a helyzet. Ezt figyelték meg a reaktív csíracentrumok és a limfómák összehasonlításakor. *Közrejátszhat ebben az Aurora-család?* Nem kétséges, hogy a szervezetben a sejtosztódás az egyik, ha nem a legbonyolultabb mechanizmus, ezért

részleteinek megismerése fontos feladat. Ennek hatékony példáját mutatják az Aurora B-vel kapcsolatos, a fentiekben csak nagyvonalakban érintett vizsgálatok.

Összességében jól szerkesztett, intelligens értekezés. A tájékozottságot mutatja a terjedelmes irodalomjegyzék, a hazai és nemzetközi elismertséget a színvonalas folyóiratokban megjelenő publikációk. A tudomány mérőszámai (amiket persze vitatni) megfelelnek az MTA doktorától elvártaknak (IF, citációk, Hirsch-index). A bíráló számára új eredményeként elismert:

(a) a morfológiai vizsgálatok molekuláris szintű fejlesztése és alkalmazhatóságuk bemutatása (lézer szkennig citometria, automatizált mikroszkópos képanalízis, digitális szkennertechrika,

(b) a keringő daganatsejtek izolálása és jellemzése,

(c) a mitotikus kinázok közül az Aurora B szerepének feltérképezése.

Mindezek vagy már igazolták jelentőségüket, vagy bizonyára fogják, feltehetően felhasználva a vizsgált terület újabb eredményeit. Utóbbi esetén tanácsolható a feleltre váró kérdések pontosabb megfogalmazása, és az eredmények bemutatása, értékelése a mindennapi onkológia szempontjából. Ezzel együtt az értekezést alkalmasnak találom megvitatásra, és ennek sikere esetén a jelölt számára az MTA doktori cím odaítélését támogatom.

Budapest, 2016. március 28.

dr. Kopper László

az MTA doktora